CYP9A17v2 组成型过量表达参与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性

杨亦桦，张 爽，周颖君，岳丽娜，吴益东*
（南京农业大学植物保护学院，农业部病虫害监测与防控重点开放实验室，南京 210095）

摘要：微粒体细胞色素 P450 氧化酶介导的解毒代谢增强是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的主要原因。作者前期的研究表明，*CYP9A12* 和 *CYP9A14* 组成型过量表达与棉铃虫 YGF 品系对拟除虫菊酯的高水平抗性相关，*CYP9A12* 和 *CYP9A14* 的功能表达研究结果为其参与对拟除虫菊酯抗性提供了直接证据。本研究通过对棉铃虫 *CYP9A17v2* 的克隆、mRNA 表达水平和功能表达的研究，以期明确该基因是否参与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性。结果表明：*CYP9A17v2* 与 *CYP9A12* 的氨基酸序列具有很高的相似性（94%）。与棉铃虫对照品系（YG）相比，*CYP9A17v2* 在 YGF 抗性品系末龄幼虫脂肪体中具有 10.9 倍的组成型过量表达，而在中肠中未发现过量表达。用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 异源表达的 *CYP9A17v2* 能够代谢多种拟除虫菊酯（顺式氰戊菊酯、溴氰菊酯和氟氯氰菊酯）。据此认为 *CYP9A17v2* 组成型过量表达参与了棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性。至此，CYP9A 亚家族中已有 3 个 P450 基因（*CYP9A12*，*CYP9A14* 和 *CYP9A17v2*）被证实参与了棉铃虫对拟除虫菊酯的氧化解毒代谢。

关键词：棉铃虫；细胞色素 P450；*CYP9A17v2* 基因；组成型过量表达；拟除虫菊酯；抗药性
中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2009)08-0852-08

Constitutive overexpression of *CYP9A17v2* is involved in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

YANG Yi-Hua, ZHANG Shuang, ZHOU Ying-Jun, YUE Li-Na, WU Yi-Dong* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects of the Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Enhanced detoxification mediated by microsomal cytochrome P450s is a major mechanism responsible for pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. Our previous study showed that constitutive overexpression of *CYP9A12* and *CYP9A14* was associated with high levels of pyrethroid resistance in the pyrethroid-resistant YGF strain of *H. armigera*, and functional expression of *CYP9A12* and *CYP9A14* in yeast provided direct evidence on their involvement in pyrethroid resistance. In this study, molecular cloning, mRNA expression, and functional expression of *CYP9A17v2* of *H. armigera* were investigated in order to verify possible involvement of *CYP9A17v2* in pyrethroid resistance. The results showed that protein sequence of *CYP9A17v2* has very high identity (94%) to that of *CYP9A12*. *CYP9A17v2* in the fat body of the final-instar larva of the YGF strain had 10.9-fold overexpression compared with that of the control strain (YG), but no overexpression was detected in the midgut. Functional expression in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) showed that *CYP9A17v2* had the capability of metabolizing several pyrethroids (esfenvalerate, deltamethrin, and cyhalothrin). It is so concluded that constitutive overexpression of *CYP9A17v2* also contributes to pyrethroid resistance in the YGF strain of *H. armigera*. Together with previous findings, three P450 genes (*CYP9A12*, *CYP9A14* and *CYP9A17v2*) from the CYP9A subfamily are confirmed to be involved in oxidative detoxification of pyrethroids in *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; *CYP9A17v2*; constitutive overexpression; pyrethroids; insecticide resistance

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 是一种重要的世界性农业害虫。由于大量使用各种不同类型的

基金项目：国家自然科学基金项目(30471154)
作者简介：杨亦桦，女，1969 年生，博士，研究方向为昆虫分子毒理学，E-mail：yhyang@njau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-04-18；接受日期 Accepted: 2009-06-18

杀虫剂进行田间防治，亚洲、非洲和澳大利亚等广大地区棉铃虫种群均对常用的有机磷类、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类杀虫剂产生了不同水平的抗性，对拟除虫菊酯类药剂产生的抗性尤为严重（McCaffery，1998）。

在棉铃虫对拟除虫菊酯抗性的解毒代谢机制研究上，大多数的研究结果证实棉铃虫 P450 介导的氧化解毒代谢增强是主要抗性机理（Kranthi *et al.*，2001；Martin *et al.*，2002；Yang *et al.*，2004；Chen *et al.*，2005；Yang *et al.*，2005）。与敏感品系相比，棉铃虫 P450 基因 *CYP9A12* 和 *CP9A14* 的 mRNA 表达量在拟除虫菊酯抗性品系末龄幼虫脂肪体中分别增加 384 倍和 62 倍，在中肠中分别增加 19 倍和 4.3 倍（Yang *et al.*，2006）。用酵母表达系统进行的异源表达研究也表明，*CYP9A12* 和 *CYP9A14* 的表达产物对 P450 氧化酶的模式底物和多种拟除虫菊酯具有明显的氧化代谢活性（Yang *et al.*，2008；张爽等，2008），从而进一步从功能上证实了这 2 个 P450 基因在棉铃虫对拟除虫菊酯抗性中的作用。

在克隆和表达棉铃虫 *CYP9A12* 和 *CYP9A14* 基因的过程中，发现了另一个细胞色素 P450 基因 *CYP9A17v2*。*CYP9A17v2* 与 *CYP9A12* 编码的氨基酸序列具有很高的相似性，为了明确这 2 个基因的异同，对它的基因组结构进行了研究。为了证明其是否也参与了棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性，本研究比较了其在棉铃虫抗、感品系不同组织中 mRNA 表达水平，并检测了其异源表达产物对拟除虫菊酯的代谢活性。

1　材料与方法

1.1　昆虫品系

棉铃虫 YG 品系是 2001 年从山东省阳谷县采集，然后在实验室中以人工饲料饲养（不接触任何药剂）。YGF 品系是用氰戊菊酯筛选 YG 品系 14 代得到的拟除虫菊酯高抗品系，YGF 品系与 YG 品系相比对氰戊菊酯具有 240 多倍的抗性（Yang *et al.*，2004）。

1.2　主要试剂

NADPH 为罗氏公司产品，购自南京大治生物科技有限公司；酵母培养基琼脂（Bacto-Agar）和蛋白胨（peptone）购自 Difco 公司；对硝基苯甲醚（*p*-nitroanisole，*p*-NA），酵母提取物，D-葡萄糖，D-半乳糖，硫酸铵，Yeast synthetic drop-out media，yeast nitrogen base without amino acid 均购自 Sigma 公司。农药标准品 99.5% 溴氰菊酯、98% 氟氯氰菊酯、98% 顺式氰戊菊酯由南京农业大学植物保护学院农药系惠赠。

1.3　总 mRNA 提取和 cDNA 合成

采用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒（Promega 公司）提取 5 头末龄幼虫脂肪体和中肠的总 RNA，具体操作按照厂家提供的操作指南进行。在 PCR 管中加入 2 μg 总 RNA、2 μL oligo（dT）$_{15}$引物和 M-MLV 逆转录酶（Promega 公司）合成 cDNA 的第一条链。每个品系制备 3 个样品（5 头为一个样品）。

1.4　棉铃虫基因组 DNA 提取和纯化

棉铃虫幼虫基因组 DNA 的提取和纯化参照周颖君等（2008）。

1.5　*CYP9A17v2* 基因全长 cDNA 的 PCR 扩增

采用上游引物 Fspa1（5′-TCAAGTAACACGTCCGTGCTTTCTAAA-3′）和下游引物 Fspa2（5′-TATAGTCCGATCAGTCGTGTCCTCTAC-3′），对棉铃虫 YGF 品系脂肪体 cDNA 进行 PCR 扩增。50 μL 的 PCR 扩增反应体系中包括：5 μL 10×Pyrobest DNA 聚合酶反应缓冲液，4 μL 2.5 mmol/L dNTP，20 μmol/L 上、下游引物各 2 μL，1 μL cDNA 模板，0.25 μL Pyrobest DNA 聚合酶，以去离子灭菌水补足 50 μL。PCR 反应条件为：94℃ 加热 3 min，然后进行如下循环，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 2 min，循环次数为 30，最后在 72℃ 条件下保持 10 min。对得到的 PCR 产物进行低熔点琼脂糖凝胶电泳后，用 Wizard PCR Preps DNA 试剂盒进行纯化；由于 Pyrobest DNA 聚合酶扩增出来的 DNA 片段末端不含有 A 碱基，对纯化后的 PCR 产物进行 A 加尾处理后连接到 pGEM-T easy 质粒载体上（Promega 公司）。由于 PCR 产物中同时具有 *CYP9A12* 和 *CYP9A17v2* 基因，因此选取能被限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 切断的阳性克隆进行测序（*CYP9A17v2* 编码区含 *Eco*RⅠ酶切位点）。

1.6　实时荧光定量 PCR 检测 P450 表达水平

分别为 *CYP9A17v2* 和一个持家基因——延伸因子-1α（*EF-1α*）设计了一对特异性引物（表 1）。25 μL 的反应体系包括：5 μL 5×实时 PCR 反应缓冲液，0.13 μL ExTaqHS DNA 聚合酶（5 U/μL），0.5 μL 250 mmol/L $MgCl_2$，0.75 μL 10 mmol/L dNTP，1.25 μL SYBR Green Ⅰ 稀释液，上游引物和下游引物各 0.13 μL，cDNA 模板 1 μL。反应条件：95℃ 5 min 进行酶的活化，95℃ 30 s，退火 30 s

(*EF-1α* 58℃, *CYP9A17v2* 55℃), 72℃延伸 45 s, 共进行 40 个循环。用 ABI Prism 7000 SDS1.1 软件进行数据记录、分析 CT 值和产生熔解曲线, 阈值线由软件自动设定。每个品系取 3 个样, 每个样至少重复 3 次。用灭菌的超纯水代替 cDNA 模板作为空白对照, 至少重复 5 次。采用比较 CT 值法(即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$法)比较目标基因的相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。

表 1 定量 PCR 的引物、目标片段大小及 GenBank 登录号

Table 1 Primer sequences, expected PCR product sizes, and GenBank accession numbers

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5′→3′)	片段长度(bp) Fragment length	登录号 GenBank accession no.
EF-1α	EF-F	GACAAACGTACCATCGAGAAG	279	U20129
	EF-R	GATACCAGCCTCGAACTCAC		
CYP9A17v2	9A17v2F	ATCACTTCGTAGACGATACCA	234	DQ003275
	9A17v2R	CATGTCTTTCCATTCTTGACC		

1.7 酵母表达及酵母细胞裂解液对拟除虫菊酯的代谢

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W(R)菌株由法国 Pompon 博士实验室提供。该菌株(*MATα*, *ade2-1*, *his3-11*, *15*, *leu2-3*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can*^{R}, *cyr*$^+$)细胞色素 P450 还原酶的 LPR1 启动子已被替换为外源的葡萄糖抑制-半乳糖诱导型启动子, 在以半乳糖为单一碳源的条件下酵母细胞色素 P450 还原酶过量表达。使用的表达载体 pYES2 购自 Invitrogen 公司, *CYP9A17v2* 酵母表达载体的构建参照 Yang 等 (2008)。酵母诱导培养采用低密度培养方法(Pompon *et al*., 1996)。酵母细胞裂解液的制备和酵母细胞裂解液对拟除虫菊酯的代谢检测方法参照张爽等(2008)。

2 结果与分析

2.1 *CYP9A17v2* 和 *CYP9A12* 基因编码的氨基酸序列比对及基因组结构

通过基于 P450 基因高度保守区域(Ⅰ螺旋区和亚铁血红素结合区)设计的简并引物成功克隆到 *CYP9A12* 和 *CYP9A14* (Yang *et al*., 2006)。*CYP9A17v2* 是从全长 *CYP9A12* PCR 产物中分离得到的, 用 *Eco*RⅠ酶切 *CYP9A12* 的 PCR 产物进行质粒重组时发现产物有一较短条带, 经克隆测序后发现了该基因。棉铃虫 *CYP9A17v2* 基因 cDNA 的完整编码序列长 1 596 bp, 编码 531 个氨基酸(GenBank 登录号 DQ003275)。*CYP9A17v2* 和 *CYP9A12* 氨基酸序列比对见图 1, *CYP9A17v2* 与 *CYP9A12* 的氨基酸序列具有 94% 的相似性。

为了明确这 2 个氨基酸序列高度相似的 P450 基因是否为同一基因的不同等位基因, 对其基因组结构进行了分析(表 2)。*CYP9A17v2* 与 *CYP9A12* 的编码区均由 9 个内含子分隔为 10 个外显子, 8 个内含子插入位点相同, 只有第 2 个内含子插入位点相距 2 个氨基酸。这 2 个基因内含子的序列和长度均有明显差异。基因组结构分析表明, *CYP9A17v2* 和 *CYP9A12* 是 2 个不同的 P450 基因, 它们其中之一起源于另一基因的一起重复事件。

2.2 棉铃虫抗性和相对敏感品系 *CYP9A17v2* 基因的 mRNA 表达水平

CYP9A17v2 基因和持家基因(对照基因) *EF-1α* 的熔解曲线均只有 1 个峰, 表明得到的产物是单一的, 无引物二聚体和非特异性目标产物产生。用 cDNA 的系列稀释液对目标基因和对照基因进行荧光定量 PCR 扩增, 结果表明它们的 PCR 扩增效率是一致的, 因此, 可以采用比较 CT 值相对定量法进行 P450 基因的 mRNA 相对表达量的比较。

棉铃虫 YGF 和 YG 品系中肠和脂肪体的 *CYP9A17v2* mRNA 相对表达水平列于表 3。在 YG 品系中, *CYP9A17v2* mRNA 相对表达量中肠组织高于脂肪体组织, 而 YGF 品系中这个基因的相对表达量在这两个组织中则相反, 脂肪体高于中肠。比较这个基因在敏感和抗性品系不同组织中的表达情况可以明显发现, 在 YGF 品系的脂肪体组织中 *CYP9A17v2* mRNA 表达水平是 YG 品系的 10.9 倍, 而在中肠中表达水平仅为 YG 品系的 1.4 倍。

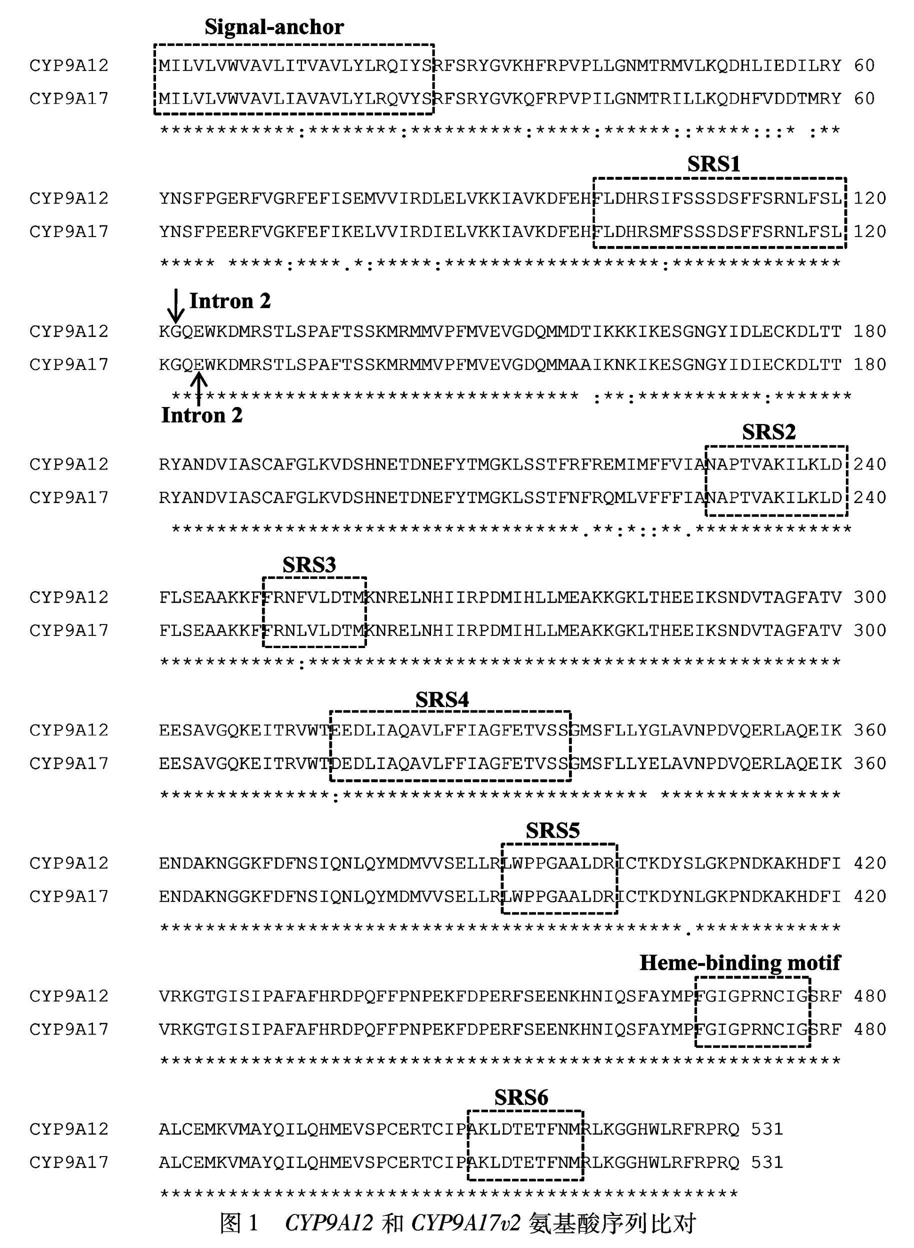


图 1　*CYP9A12* 和 *CYP9A17v2* 氨基酸序列比对

Fig. 1　Alignment of *CYP9A12* and *CYP9A17v2* amino acid sequences

推测的底物识别位点、血红素结合基序和锚定信号序列以虚线框标示；*CYP9A12* 和 *CYP9A17v2* 的 GenBank 登录号分别为 AY371318 和 DQ003275。Predicted substrate recognition sites (SRSs), a heme-binding motif and a signal anchor sequence are boxed with broken lines. GenBank accession numbers of *CYP9A12* and *CYP9A17v2* are AY371318 and DQ003275, respectively.

表 2　棉铃虫 *CYP9A17v2* 和 *CYP9A12* 基因的内含子/外显子结构

Table 2　The intron/exon organization of *CYP9A17v2* and *CYP9A12* of *Helicoverpa armigera*

外显子 Exon	碱基位置 Nucleotide position *	外显子长度 Exon size (bp)	外显子两端序列 Exon sequence (5′→3′)	内含子长度 Intron size (bp)	内含子两端序列 Intron sequence (5′→3′)
CYP9A12 (EU327673)					
1	1 – 203	203	<u>ATG</u>ATACTA……TGGAGAGAG	256	gtgaggaaa……tgttcacag
2	460 – 620	161	GTTCGTGGG……CTTTGAAAG	90	gtatgggaa……ttttcacag
3	711 – 848	138	GTCAAGAAT……AATCTGGAA	168	gtacgtgtg……cttttacag
4	1 017 – 1 219	203	ATGGCTACA……GTTGCTAAG	834	gtacgtgaa……tgtctacag

续表 2 Table 2 continued

外显子 Exon	碱基位置 Nucleotide position *	外显子长度 Exon size (bp)	外显子两端序列 Exon sequence (5′→3′)	内含子长度 Intron size (bp)	内含子两端序列 Intron sequence (5′→3′)
5	2 054 – 2 189	136	ATCCTTAAA……CTAAAAAAG	81	gtaaacgtg……atttttcag
6	2 271 – 2 366	96	GTAAACTGA……TTACTAGAG	531	gtgcgttga……aaattccag
7	2 898 – 3 119	222	TGTGGACTG……TTGTGTCCG	116	gtaagcata……tttttacag
8	3 236 – 3 336	101	AACTGCTGC……GATTTTATT	180	gtgagttaa……catctacag
9	3 517 – 3 685	169	GTACGCAAA……ATTGTATAG	357	gtgaggact……atttctcag
10	4 043 – 4 209	167	GATCAAGAT……AGGCAG TAG	–	–
CYP9A17v2 (FJ416332)					
1	1 – 203	203	ATGATACTA……TGAAGAGAG	263	gtaaggctt……tgttcacag
2	467 – 633	167	GTTTGTGGG……AAGGTCAAG	92	gtatggaaa……tttttaaag
3	726 – 857	132	AATGGAAAG……AATCTGGAA	161	gtacgtgtg……cttttacag
4	1 019 – 1 221	203	ATGGCTATA……GTTGCTAAG	1 494	gtacctgaa……tgtctacag
5	2 716 – 2 851	136	ATCCTTAAA……CTAAAAAAG	72	gttgtttta……atttttcag
6	2 924 – 3 019	96	GTAAACTGA……TTACTAGAG	534	gtgcgttga……aaattccag
7	3 554 – 3 775	222	TGTGGACTG……TTGTGTCTG	122	gtaagcata……tcttttcag
8	3 898 – 3 998	101	AACTGCTGC……GATTTTATT	187	gtgagttaa……catctacag
9	4 186 – 4 354	169	GTCCGCAAA……ATTGTATAG	373	gtgaggact……atttctcag
10	4 728 – 4 894	167	GATCAAGAT……AGGCAG TAG	–	–

* 相对于翻译起始位点 Relative to the translation start site.

2.3 重组酵母表达产物对拟除虫菊酯的代谢

用气相色谱检测了含有外源细胞色素 P450 基因 *CYP9A17v2* 及不含有外源细胞色素 P450 基因的酵母细胞裂解液对拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢情况(表4)。含有 *CYP9A17v2* 外源基因的重组酵母细胞裂解液对溴氰菊酯、氟氯氰菊酯和顺式氰戊菊酯均具有代谢降解活性，而不含有外源细胞色素 P450 基因的酵母细胞裂解液均检测不到对这 3 种拟除虫菊酯的代谢。上述结果表明 *CYP9A17v2* 在酵母系统中的表达产物具有代谢拟除虫菊酯的能力，从而在功能上证实了 *CYP9A17v2* 的过量表达在棉铃虫对拟除虫菊酯抗性中的作用。

表 3 *CYP9A17v2* 基因在棉铃虫末龄幼虫中肠和脂肪体中的相对表达量

Table 3 Relative expression level of *CYP9A17v2* in the midgut and fat body of the final instar larva of *Helicoverpa armigera*

品系 Strain	组织 Tissue	相对表达量 Relative expression level *	R **
YG	中肠 Midgut	1.0(0.55 – 1.83)	
	脂肪体 Fat body	0.29(0.25 – 0.33)	
YGF	中肠 Midgut	1.44(1.14 – 1.83)	1.4
	脂肪体 Fat body	3.14(2.87 – 3.43)	10.9

* 基因表达量的相对范围 The range of gene expression level determined by evaluating $2^{-\Delta\Delta C_T}$ with $\Delta\Delta C_T + SE$ and $\Delta\Delta C_T - SE$; ** R = YGF 品系某组织中的相对表达量/YG 品系相同组织的相对表达量 R = Tissue-specific relative expression level in YGF strain/tissue-specific relative expression level in YG strain.

表 4 棉铃虫 P450 基因 *CYP9A17v2* 酵母表达产物对拟除虫菊酯类药剂的代谢

Table 4 Metabolism of pyrethroids by *Helicoverpa armigera* *CYP9A17v2* expressed in yeast

转化质粒 Transformed vector	降解活性 Degradation activity (pmol/min · mg protein)		
	溴氰菊酯 Deltamethrin	氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	顺式氰戊菊酯 Esfenvalerate
pYES2	ND	ND	ND
pYES2-*CYP9A17v2*	9.06 ± 3.25	5.61 ± 0.85	1.71 ± 0.35

ND: 未检测到代谢活性 Not detectable. 表中数据为平均值 ± *SE*。Data in the table are mean ± *SE*.

3 讨论

细胞色素 P450 氧化酶作为一个各种不同生物体如细菌、真菌、植物和动物体内广泛存在的代谢系统，在各种内源化合物的生物合成和代谢以及外源化合物的降解和转化中均发挥着重要的作用(Feyereisen，1999)。而在昆虫体内，一个或多个 P450 基因的过量表达导致细胞色素 P450 氧化酶解毒代谢增强是导致其对杀虫剂产生抗性的重要原因之一(Scott，1999；Feyereisen，1999，2005)。

抗性昆虫细胞色素 P450 基因的组成型过量表达在一些昆虫中表现为单一 P450 基因的过量表达。在家蝇 *Musca domestica* 二嗪农抗性品系中 CYP6A1 有 3 倍的过量表达，而与它同在家蝇 5 号染色体上的一个 P450 基因簇的 *CYP6A3*，*CYP6A4*，*CYP6A5*，*CYP6A6*，*CYP6C1* 和 *CYP6C2* 则没有过量表达(Cohen and Feyereisen，1995)。在抗氯氰菊酯的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 抗性品系成虫中，在 14 个 CYP6 家族基因中也只发现 *CYP6Z1* 存在过量表达(Nikou *et al*.，2003)。在德国蜚蠊 *Blattella germanica* 上，已经克隆了 *CYP6L1*，*CYP6J1*，*CYP6K1*，*CYP9E2* 和 *CYP4C21* 等 P450 基因，只有 *CYP4G19* 的过量表达与拟除虫菊酯抗性相关(Wen *et al*.，2001；Wen and Scott，2001a，2001b；Pridgeon *et al*.，2003)。Daborn 等(2002)将果蝇 90 个细胞色素 P450 基因制成微阵列芯片，分析了 2 个抗 DDT 田间品系(Hikone-R 和 WC2)的 P450 基因的表达情况，只发现 *Cyp6g1* 有过量表达，再用定量 PCR 技术分析来自世界各地的 20 个田间抗性种群发现 *Cyp6g1*mRNA 的表达量是敏感个体的 10 ~ 100 倍。分析所有的抗性个体 *Cyp6g1* 基因序列均发现在其 5′端有保守的 *Accord* 转座子插入，表明这个抗性等位基因可能是单一起源随后全球扩散(Denholm *et al*.，2002)。*Cyp6g1* 的过量表达还可以导致对对 DDT、新烟碱类杀虫剂吡虫啉、有机磷杀虫剂马拉硫磷和昆虫生长调节剂 lufenuron 的交互抗性(Daborn *et al*.，2001；Le Goff *et al*.，2003)。最近还发现，用烟草 *Nicotiana tabacum* 细胞异源表达的 *Cyp6g1* 具有代谢 DDT 和吡虫啉的能力(JouBen *et al*.，2008)。

在多种抗性昆虫中，有多个 P450 基因的过量表达与抗药性相关。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 上，*Cyp6a2*，*Cyp6a8* 和 *Cyp6a9* 在 91-R 抗性品系中过量表达(Waters *et al*.，1992；Maitra *et al*.，1996，2000)，*Cyp6a2* 和 *Cyp4e2* 在 RDDT[R] 品系中过量表达(Amichot *et al*.，1994；Brun *et al*.，1996)。在抗溴氰菊酯淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 中，通过微阵列分析和 Northern 杂交均证明 *CYP4H21*，*CYP4H22v1*，*CYP4J4v2*，*CYP4J6v1* 和 *CYP4J6v2* 有 3.1 ~ 7.7 倍的过量表达(Shen *et al*.，2003)。在小菜蛾 *Plutella xylostella* 对氯菊酯抗性品系中，*CYP6BG1* 和 *CYP6BG2* 均有组成型过量表达，通过 RNAi 干扰 *CYP6BG1* 的正常表达后，小菜蛾对氯菊酯的抗性明显下降且对氧化酶模式底物的代谢活力也降低(Bautista *et al*.，2007，2009)。

棉铃虫寄主作物广泛，具有很强的解毒代谢系统，P450 酶系是其中重要的一类解毒代谢酶。在棉铃虫对拟除虫菊酯的不同抗性品系中存在着多个 P450 基因的过量表达，如 *CYP4G8*，*CYP6B7*，*CYP6AE12* 及 *CYP337B1*(Pittendrigh *et al*.，1997；Ranasinghe and Hobbs，1998；岳丽娜等，2007；Wee *et al*.，2008)。综合本研究室的研究结果，可以发现至少有 3 个属于 CYP9A 亚家族的 P450 基因(*CYP9A12*，*CYP9A14* 和 *CYP9A17v2*)存在组成型过量表达，而且通过酵母表达系统证实了这 3 个基因均具有代谢拟除虫菊酯的能力(Yang *et al*.，2006，2008)，因此棉铃虫 YGF 抗性品系对拟除虫菊酯的抗性形成至少与这 3 个 P450 基因的过量表达有关。

参 考 文 献 (References)

Amichot M，Brun A，Cuany A，Helvig C，Salaun JP，Durst F，Berge JB，1994. Expression study of CYP genes in *Drosophila* strains resistant or sensitive to insecticides. In：Lechner MC ed. Cytochrome P450. John Libbey Eurotext，Paris. 689 – 692.

Bautista MAM，Tanaka T，Miyata T，2007. Identification of permethrin-inducible cytochrome P450s from the diamondback moth：*Plutella xylostella* (L.) and the possibility of involvement in permethrin resistance. *Pestic. Biochem. Physiol*.，87：85 – 93.

Boutista MAM，Miyata T，Miura K，Tanaka T，2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450，*CYP6BG1*，from the diamondback moth，*Plutella xylostella*，reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，39：38 – 46.

Brun A，Cuany A，Le Mouel T，Berge J，Amichot M，1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene，*CYP6A2*，by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，26：697 – 703.

Chen S，Yang YH，Wu YD，2005. Correlation between fenvalerate resistance and cytochrome P450-mediated *O*-demethylation activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera：Noctuidae). *J. Econ. Entomol*.，98：943 – 946.

Cohen MB，Feyereisen R，2005. A cluster of cytochrome P450 genes of

the CYP6 family in the house fly. *DNA Cell Biol.*, 14: 73 – 82.

Daborn PJ, Boundy S, Yen JL, Pittendrigh B, ffrench-Constant RH, 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with *Cyp6g1* overexpression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 556 – 563.

Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham, Wilson TG, ffrench-Constant RH, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297: 2 253 – 2 256.

Denholm I, Devine GJ, Williamson MS, 2002. Insecticide resistance on the move. *Science*, 297: 2 222 – 2 223.

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507 – 533.

Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert L, Iatrou K, Gill S eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier Pergamon, Oxford. 4: 1 – 77.

JouBen N, Heckel DG, Haas M, Schuphan I, Schmidt B, 2008. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in *Cyp6g1*-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Manag. Sci.*, 64: 65 – 73.

Kranthi KR, Jadhav D, Wanjari R, Kranthi S, Russell D, 2001. Pyrethroid resistance and mechanism of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepdoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 94: 253 – 263.

Le Goff G, Boundry S, Daborn PJ, Yen JL, Sofer L, Lind R, Sabourault C, Madi-Ravazzi L, ffrench-Constant RH, 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 701 – 708.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Maitra S, Dombrowski SM, Basu M, Raustol O, Waters LC, Ganguly R, 2000. Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 248: 147 – 156.

Maitra S, Dombrowski SM, Waters LC, Ganguly R, 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 180: 165 – 171.

Martin T, Chandre F, Ochou OG, Vaissayre M, Fournier D, 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepdoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74: 17 – 26.

McCaffery AR, 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353: 1 735 – 1 750.

Nikou D, Ranson H, Hemingway J, 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 318: 91 – 102.

Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovsky E, Andreev O, Campbell B, Daly J, Trowell S, ffrench-Constant RH, 1997. Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a pyrethroid-susceptible and -resistant strain. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 507 – 512.

Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P, 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology*, 272: 51 – 64.

Pridgeon JW, Zhang L, Liu NN, 2003. Overexpression of *Cyp4g19* associated with a pyrethroid-resistant strain of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Gene*, 314: 157 – 163.

Ranashinghe C, Hobbs A, 1998. Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for *CYP6B6* and *CYP6B7* from *Helicoverpa armigera* (Hübner): Possible involvement of *CYP6B7* in pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 571 – 580.

Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticides resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757 – 777.

Shen B, Dong HQ, Tian HS, Ma L, Li XL, Wu GL, Zhu CL, 2003. Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and -resistance strains of *Culex pipiens pallens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 75: 19 – 26.

Waters LC, Zelhof AC, Shaw BJ, Chang LY, 1992. Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *PNAS*, 89: 4 855 – 4 859.

Wee CW, Lee SF, Robin C, Heckel DG, 2008. Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. *Insect Mol. Biol.*, 17: 351 – 360.

Wen ZM, Scott JG, 2001a. Cytochrome P450 *CYP6L1* is specifically expressed in the reproductive tissues of adult male German cockroaches, *Blattella germanica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 179 – 187.

Wen ZM, Scott JG, 2001b. Cloning of two novel P450 cDNAs from German cockroaches, *Blattella germanica CYP6K1* and *CYP6J1*. *Insect Mol. Biol.*, 10: 131 – 137.

Wen ZM, Horak C, Scott JG, 2001. *CYP9E2*, *CYP4C21* and related pseudogenes from German cockroaches, *Blattella germanica*: Implications for molecular evolution, expression studies and nomenclature of P450s. *Gene*, 272: 257 – 266.

Yang EH, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2005. Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *J. Appl. Entomol.*, 129: 521 – 525.

Yang YH, Chen S, Wu SW, Yue LN, Wu YD, 2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *J. Econ. Entomol.*, 99: 1 784 – 1 789.

Yang YH, Wu YD, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 763 – 773.

Yang YH, Yue LN, Chen S, Wu YD, 2008. Functional expression of *Helicoverpa armigera CYP9A12* and *CYP9A14* in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 92：101 –105.

Yue LN, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2007. Cloning and mRNA expression levels of cytochrome P450 gene *CYP6AE12* & *CYP9A18* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomologica Sinica*, 50：234 –240.［岳丽娜，杨亦桦，武淑文，吴益东，2007. 棉铃虫 P450 基因 CYP6AE12 & CYP9A18 的克隆与 mRNA 表达水平. 昆虫学报，50：234 –240］

Zhang S, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2008. Metabolism of pyrethroids by *Helicoverpa armigera* cytochrome P450 gene *CYP9A12* heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Entomologica Sinica*, 51(12)：1 255 –1 259.［张爽，杨亦桦，武淑文，吴益东，2008. 棉铃虫 P450 基因 *CYP9A12* 酵母表达产物对拟除虫菊酯的代谢作用. 昆虫学报，51：1 255 –1 259］

Zhou YJ, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2008. Cloning and sequence analysis of the 5′-upstream region of cytochrome P450 gene *CYP9A12* of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomologica Sinica*, 51：120 – 125.［周颖君，杨亦桦，武淑文，吴益东，2008. 棉铃虫细胞色素 P450 *CYP9A12* 基因 5′-上游区的克隆及序列分析. 昆虫学报，51：120 –125］

（责任编辑：赵利辉）